



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

유자씨와 유자씨 유지 메탄올 추출물의
리모노이드류 분석 및 암세포 성장 억제
효과

Components in Methanol Extracts from Yuja Seeds and
Yuja Seed Oil and Their Anti-proliferative Effects on
HT-29 Human Colon Cancer Cells

2014년 8월

서울대학교 대학원

식품영양학과

김 경 은

국문 초록

유자씨와 유자씨 유지 메탄올 추출물의 리모노이드류 분석 및 암세포 성장 억제 효과

김경은

서울대학교 대학원 식품영양학과

유자(*Citrus junos*)는 다양한 생리활성 기능을 갖고 있어 한국을 포함한 아시아 지역에서 널리 소비되고 있는 감귤류 과일이다. 국내에서 소비되는 유자의 대부분은 유자청의 형태로 가공되어 이용되고 있다. 이 과정에서 부산물로 생성되는 유자씨는 지질을 다량 포함하고 있어, 유자씨에서 유지를 착유하여 식용과 미용에 이용된다. 본 연구의 목적은 유자씨와 유자씨 유지 추출물의 인간 대장암세포(HT-29)에 대한 암세포 성장 억제 효과를 확인하고, 이 억제 효과에 영향을 주는 주요 물질을 확인하며, 이를 통하여 식품과 의약 산업에서의 유자씨와 유자씨 유지의 활용을 위한 기초를 제공하고자 하는 것이다.

유자씨와 헥산 추출 유자씨 유지와 냉압착 유자씨 유지로부터 60% 메탄올을 이용하여 추출물을 얻은 후, HPLC-MS로 추출물의 조성을 분석하고, HT-29 세포에의 처리를 통해 추출물의 성장 억제 효과를 확인하였다. 그리고 preparative

LC로 추출물을 분획하여 분획물의 생장 억제 효과와 조성을 확인하였다. 또한, 효과가 있는 분획물 내의 주요 성분의 생장 억제 효과와 조성을 확인하였다.

유자씨와 유자씨 유지 추출물을 분석한 결과, limonin glucoside, deacetyl nomilinic acid glucoside, isoobacunoic acid glucoside, deoxylimonol, nomilin glucoside, obacunone glucoside, bergapten, isopimpinellin, isoobacunoic acid, byakangelicin limonin, calamin, ichangensin, nomilin 등이 존재했다. 그리고 유자씨 추출물에는 limonin과 nomilin이 각각 111.4 ± 15.2 와 103.4 ± 6.5 mg/100 g dry seed이 존재하였고, 냉압착 유지 추출물에는 각각 52.2 ± 3.4 와 93.0 ± 7.3 mg/100 g oil이 존재하였으나, 헥산 추출 유지 추출물에서는 거의 검출되지 않았다.

유자씨와 유자씨 유지 추출물의 HT-29 세포에 대한 생장 억제 효과를 확인한 결과, 헥산 추출 유지의 추출물과 냉압착 유지의 추출물 모두에서 유의적으로 암세포 생장이 감소하였다(IC₅₀(24시간): 헥산 추출 유지: 0.176 mg/mL, 냉압착 유지: 0.182 mg/mL; IC₅₀(48시간): 헥산 추출 유지: 0.116 mg/mL, 냉압착 유지: 0.114 mg/mL). 반면, 유자씨 추출물과 limonin, nomilin은 24시간과 48시간 처리 후에 암세포 생장 억제 효과가 없었다.

헥산 추출 유지의 메탄올 추출물을 분획한 6개의 추출물(A-F)과 냉압착 유지의 메탄올 추출물을 분획한 4개의 추출물(I-IV) 중에서 헥산 추출 유지 추출물의 C, E, F 분획물과 냉압착 유지 추출물의 III, IV 분획물이 암세포 생장 억제 효과가 있었다. 분획물 C, E, F, IV는 24시간과 48시간 처리하였을 때 유의적으로 암세포 생장을 감소시켰고, 분획물 III는 48시간 처리하였을 때 유의적인 감소효과가 있었다(IC₅₀(24시간): C: 63.9 μ g/mL, E: 57.8 μ g/mL, F: 72.5 μ g/mL; IC₅₀(48시간): C: 33.9 μ g/mL, E: 48.9 μ g/mL, F: 30.6 μ g/mL, IV: 61.1 μ g/mL).

분획물의 분석 결과, 헥산 추출 유지 추출물의 분획물 C는 heptadecyl methoxybenzoate와 isoobacunoic acid가, 분획물 E는 isopimpinellin, bergapten, ichangensin이, 분획물 F는 ichangensin이 주요한 물질일 것으로 추정된다. 냉압착 유지 추출물의 분획물 III는 deoxylimonol이, 분획물 IV는 heptadecyl methoxybenzoate가 주요 물질일 것으로 추정된다. 위의 암세포 성장 억제 효과가 있는 분획물 내의 물질 중에서 ichangensin을 HT-29 세포에 처리하였을 때 유의적인 성장 억제 효과를 보였으나, isopimpinellin과 bergapten은 어느 정도 성장 억제 효과를 보였으나 유의적이지는 않았다.

결론적으로, 유자씨 유지 추출물과 그 분획물의 일부가 HT-29 세포에 대한 성장 억제 효과를 보임을 확인하였다. 효과가 있는 분획물 내에 있는 물질을 확인한 결과, isopimpinellin, bergapten, ichangensin이 유자씨 유지내의 주요 암세포 성장 억제 물질이며, ichangensin이 가장 높은 활성을 보였다. 따라서, 본 연구를 통하여 유자씨 유지는 기능성 소재로서의 새로운 식품 자원으로서의 활용 가능성을 알 수 있다.

주요어: 유자씨 유지; yuja seed oil; 유자씨; limonoid; ichangensin; 암세포 성장 억제 효과

학번: 2012-21487

목 차

국문 초록	I
목차	IV
List of Tables	VI
List of Figures	VII
I. 서론	1
1. 유자의 이용과 유자씨 유지	1
2. Limonoids	1
3. Furanocoumarins	3
4. 연구 목적	3
II. 재료 및 방법	4
1. 실험 재료	4
2. 유자씨의 일반 성분 분석	4
2.1. 수분 함량 측정	4
2.2. 조지방 함량 측정	4
3. 유자씨 유지의 지방산 조성 분석	5
4. 유자씨와 유자씨 유지로부터 헥산 또는 메탄올 가용물질 추출	6
4.1 유자씨로부터 헥산 가용물질 추출	6
4.2 유자씨로부터 메탄올 가용물질 추출	6
4.3. 유자씨 유지로부터 메탄올 가용물질 추출	8
4.4. 유자씨 유지 추출물의 분획	8
4.5. 유자씨 메탄올 가용 추출물로부터의 ichangensin 분획	9
5. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 HPLC를 이용한 limonin과 nomilin의 정량 분석	9

6. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물과 분획물의 HPLC-ESI-MS 분석	10
7. 세포배양	10
8. 생장 억제 효과 측정	11
9. 통계분석	12
 III. 결과 및 고찰	
1. 유자씨의 수분 및 조지방 함량	13
2. 유자씨 유지의 지방산 조성	13
3. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 limonin과 nomilin의 함량	15
4. 유자씨와 유자씨 유지의 추출물의 조성	15
5. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 암세포 생장 억제 효과	18
6. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 분획물의 암세포 생장 억제 효과	20
7. 유자씨와 유자씨 유지 메탄올 추출물의 분획물의 분석	22
8. Isopimpinellin, bergapten, ichangensin의 암세포 생장 억제 효과	29
 IV. 결론	31
 참고 문헌	33
 Abstract	37

List of Tables

Table 1. Fatty acid composition of yuja seed oils.....	14
Table 2. Identification of HPLC–ESI–MS peaks for yuja seeds and yuja seed oils.....	17
Table 3. Identification of the HPLC–ESI–MS peaks for the fractions from yuja seed oils.....	26

List of Figures

Fig. 1. Flowchart of extraction process.....	7
Fig. 2. HPLC–ESI–MS chromatograms of the extracts of yuja seeds and yuja seed oils.....	16
Fig. 3. Viability of HT–29 cells treated with the extracts of yuja seeds and yuja seed oils, limonin, and nomilin for 24 and 48 h.....	19
Fig. 4. Viability of HT–29 cells treated with the fractions from yuja seed oils for 24 h and 48 h.....	21
Fig. 5. HPLC–ESI–MS chromatograms of fractions from yuja seed oils	23
Fig. 6. Mass spectra of fractions from yuja seed oils, isopimpinellin, bergapten, and ichangensin.....	24
Fig. 7. Viability of HT–29 cells treated with isopimpinellin, bergapten, and ichangensin.....	30

I. 서론

1. 유자의 이용과 유자씨 유지

유자(*Citrus junos*)는 *Citrus* 속의 상록수인 유자나무의 과실로 타원형에 노란 빛깔을 띤다. 한국, 중국, 일본 등에서 식용으로 이용되어 왔다. 유자는 향이 좋으나, 신맛이 강하여 예로부터 생식하기보다는 음료, 잼, 술, 주스, 분말차, 그리고 유자청으로 만들어 이용해 왔다. 국내에서는 주로 유자차로 음용하기 위한 유자청의 형태로 생산되는데, 2009년 통계청 기준으로 유자 제품 중에서 약 45%가즙청의 형태로 가공되었다. 유자청으로 가공 시에 유자씨가 부산물로 생성되는데, 유자씨에는 지질이 약 35%(권 등, 2006)가 포함되어있어, 유자씨로부터 유자씨 유지를 착유할 수 있다. 착유된 유자씨 유지는 주로 식용과 미용 목적으로 이용되고 있다.

2. Limonoids

Limonoid는 트리테르펜 유도체의 형태로, 유자내에 함유되어있는 생리활성 물질 중 하나이다. Limonoid는 aglycone과 glycoside의 형태가 있다. Citrus 내의 limonoid에 대한 초기의 연구는 대부분 극성용매를 이용하여 추출한 것은 버리고, 비극성 용매를 이용하여 추출한 것에 존재하는 limonoid aglycone에 치중되어 있었다(Miller 등, 2006). 예를 들어, Emerson 등(1948)은 벤젠과 아세톤을 이용하여 navel orange 주스와 valencia orange의 종자로부터 각각 limonin을 추출하였다고 보고하였다. 그러나 점점 연구자들은 극성용매를 이용한 citrus의 추출물 내에서 발견되는 limonoid glycoside에 대해 관심을 갖기 시작하였다. Hasegawa 등(1989)은 grapefruit 종자의 메탄올 추출물로부터 많은 limonoid

glucoside를 확인하였으며, Herman 등(1990)은 orange juice로부터 HPLC와 TLC를 이용하여 limonin glucoside, nomilin glucoside, nomilinic glucoside, deacetylnomilnic acid glucoside, obacunone glucoside 등의 limonoid glucoside를 획득하였다.

Ichangensin은 limonoid에 속하는 물질로, *Citrus ichangensis*와 그 교배종인 *Citrus junos*, *C. sudachi*, *C. sphaerocarpa* 등에서 발견되는 물질이다(Herman 등, 1989; Herman 등, 1992; Nakagawa 등, 2001; Ozaki 등, 1991). Ichangensin은 ketal과 keto 형태의 두 가지의 isomer가 있으나, citrus 내에는 ketal 형태만이 존재한다고 알려져 있다(Hasegawa 등, 2980). 유자 씨 내에 함유된 limonoid 중에서 ichangensin은 15.6%를 차지하고 있다(Hu-hua 등, 1996).

Limonoid는 항염증 효과와 암세포 성장 억제 효과가 있다고 알려져 있는데, 유방암, 위암, 구강암 세포에 대한 성장 억제 효과가 알려져 있다(Bray 등, 1990; Guthrie 등, 2000; Miller 등, 1989; Tian 등, 2001). 특히, limonin, nomlin, limonin glucoside는 대장암세포에 대한 성장 억제 효과가 알려져 있다(Bray 등, 1990; Poulouse 등, 2006; Murthy 등, 2011; Miller 등, 2004). Limonin과 limonin glucoside의 대장암세포(SW480)의 성장억제 효과에 대한 비교 연구에서는 이 limonoid들이 모두 효과적이었으나, limonin glucoside가 limonin에 비해서 더 효과적이라고 밝혔다(Murthy 등, 2011). 또 다른 비교연구에서는 오렌지 씨로부터 획득한 limonin, deacetylnomilin, nomilin, obacunone, limonin glucoside, obacunone glucoside nomilinic acid glucoside이 인간 대장암세포(Caco-2)와 신경아세포종세포(SH-SY5Y)에 대하여 유의적인 성장 억제 효과를 보였고, limonoid glycoside들이 aglycone들보다 더 효과적이었다고 밝혔다(Poulouse 등, 2006). Miller 등(2004)은 햄스터에 7,12-dimethylbenz(a)anthracene로 유발한 경구 종양에 대한 ichangensin, deoxylimonin, obacunone의 억제 효과를

연구하였고, 이 중에서 deoxylimonol이 가장 효과적임을 밝혔다.

3. Furanocoumarins

Xanthotoxin, isopimpinellin, bergapten 등의 furanocoumarin은 *Citrus*가 속해있는 Rutaceae 과의 식물들에서 발견되는 물질이다. Dugrand 등(2013)은 sweet orange, lemon, grapefruit, bergamot, pummelo, clementine의 껍질의 추출물에서 furanocoumarin을 확인하였다. 그리고 bergamot, lemon, grapefruit, mandarin, tangerine, bitter orange로부터 추출한 유지에서도 이 물질들이 확인되었다(Frërot 등, 2004).

이 물질들은 암세포 성장 억제 효과가 있다고 알려져 있는데, Um 등(2010)은 xanthotoxin, isopimpinellin, bergapten의 인간 대장암세포(HT-29)에 대한 농도 의존적인 성장 억제 효과를 확인하였다. 또한 Kong 등(2010)은 xanthotoxin, isopimpinellin, bergapten의 인간 위암세포(AGS), 인간 섬유육종세포(HT1080), 인간 백혈병세포(U937)에 대한 성장 억제 효과를 확인하였다.

4. 연구 목적

유자씨와 유자씨 유지 내에는 위와 같은 다양한 생리활성 물질이 존재하지만, 유자씨와 유자씨 유지 내의 생리활성 물질에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물이 인간 대장암세포(HT-29 세포)의 성장 억제 효과가 있는지 확인하고, 이 억제 효과에 영향을 주는 주요 물질을 탐색하고자 하였다. 이를 통하여 식품과 의약 산업에서의 유자씨와 유자씨 유지의 활용 및 제품 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 유자씨는 2012년과 2013년에 경상남도 통영에서 수확한 유자의 유자씨를 이용하였다. 유자씨와 냉압착 유자씨 유지는 진희(통영, 한국)에서 제공받아 이용하였다. 유자씨는 수세 후 열풍 건조(60°C, 12시간)한 것을 제공받아 사용 전까지 냉동(-20°C) 보관하면서 분석에 사용하였다.

2. 유자씨의 일반 성분 분석

2.1. 수분 함량 측정

수분은 식품공전(Korea Food & Drug Administration, 2012)의 방법에 따라 상압 가열 건조법으로 분석하였다. 시료 3.00 g을 정확히 칭량하여 105°C의 dry oven에 넣어 건조하고, 데시케이터에 넣어서 뚜껑을 닫고 실온이 될 때까지 30분간 방냉한 후 칭량하였다. 항량이 될 때까지 이와 같은 건조, 방냉, 칭량을 반복하여 수분 함량을 구하였다.

수분(%)

$$= 100 \times (\text{건조 후 시료가 들어있는 수기의 항량} - \text{수기의 항량}) / \text{시료의 채취량}$$

2.2. 조지방 함량 측정

조지방 함량은 Soxhlet 추출법으로 분석하였다. 분쇄된 건조 유자씨 5 g을 원통여과지에 칭량하여 탈지면으로 윗부분을 막은 후, Soxhlet 지방 추출장치에 넣고 ether(Samchun Pure Chemicals, Pyeongtaek, Korea)를 이용하여 16시간 동안 추출하였다. 추출이 끝나고 수기에 남아있는 ether를 증발시키고 104°C의 dry oven에서 건조시켜 칭량하였다. 항량이 될 때까지 건조, 방냉, 칭량을

반복하여 조지방 함량을 구하였다.

조지방(%)

$= 100 \times (\text{추출물이 들어있는 수기의 함량} - \text{수기의 함량} / \text{시료의 채취량})$

3. 유자씨 유지의 지방산 조성 분석

지방산 조성은 AOCS 방법(AOCS, 1989)에 따라 분석하였다. 시료는 헥산을 이용하여 추출한 유자씨 유지와 업체로부터 제공받은 냉압착한 유자씨 유지를 분석하였다. 지질 0.25 g을 50 mL의 round-bottomed flask에 취한 후, 0.5 N methanolic NaOH (Samchun Chemical Co.) 6 mL를 가하여 용해하였다. Flask를 condenser에 연결하여 가열기 위에 놓고 지방구가 없어질 때까지 80°C에서 10분간 가열했다. BF₃-methanol solution(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 7 mL 넣은 후 2분간 끓였다. Hexane을 5 mL를 가하고 1분간 가열한 다음, flask에서 condenser를 제거하고 상온에서 냉각시켰다. 포화 NaCl 용액을 넣어 hexane 층이 목 부위로 차오르게 한 뒤, hexane 층에서 1 mL 취하여 vial에 옮겨 질소를 충전했다. 이것을 6890 gas chromatography(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 다음과 같은 조건으로 분석하였다. 컬럼은 DB-23(J&W scientific, Folsom, CA, USA)를 이용하였고, injector는 split ratio를 50:1로 하여 온도를 240°C로 설정하였다. Detector는 flame ionization detector로서 온도는 250°C로 설정하였다. Carrier gas는 helium을 이용하였으며, 유속은 1.4 mL/min으로 하였다. 오븐 온도는 초기에 160°C에서 2분 동안 정치하고, 3.5°C/min으로 250°C까지 올려 5분 동안 정치한 후, 25.0°C/min으로 260°C까지 올려서 5분 동안 정치하였다. 지방산의 함량을 표준지방산(Nu-Chek-Prep, Inc., Elysian, MN, USA)의 검출 시간과 비교하여 분석하였다.

4. 유자씨와 유자씨 유지로부터 헥산 또는 메탄올 가용물질 추출

4.1. 유자씨로부터 헥산 가용물질 추출

유자씨의 헥산 가용물질 추출 방법은 Fig. 1과 같다. 유자씨를 믹서기(HMF-347(E); Hanil Electric Co., Bucheon, Korea)로 분쇄하여 분말 상태로 만든 후, 유자씨 분말 200 g에 hexane(Samchun Chemical Co., Seoul, Korea) 1000 mL를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 stirrer(MSH-20D; Daihan Scientific, Seoul, Korea)를 이용하여 400 rpm으로 교반추출하였다. 이후, hexane과 씨 분말의 혼합물을 깔때기와 Whatman No. 2 filter paper(Whatman International Ltd., Maidstone, England)를 이용하여 여과하였다. 여과 후 남은 씨 분말을 위의 추출 과정을 2번 더 반복하여 추출하여 추출물을 모아 40°C에서 감압농축기(A-10005; Eyela Co., Tokyo, Japan)로 hexane을 제거하였다. 시료는 질소를 충전한 뒤 사용 전까지 냉장(4°C) 보관하면서 분석에 사용하였다.

4.2. 유자씨로부터 메탄올 가용물질 추출

유자씨의 메탄올 가용물질 추출은 Fig. 1과 같이 진행하였다. 유자씨를 믹서기(Hanil Electric Co.)로 분쇄하여 분말 상태로 만든 후, 유자씨 분말 10 g에 60% methanol 100 mL를 가하여 상온에서 1시간 10분 동안 stirrer(Daihan Scientific)를 이용하여 400 rpm으로 교반하였다. 그리고 methanol과 씨 분말의 혼합물을 깔때기와 Whatman No. 1 filter paper(Whatman International Ltd.)를 이용하여 여과하였다. 여과 후 남은 씨 분말을 위의 추출 과정을 2번 더 반복하여 추출하여 추출물을 모아 40°C에서 감압농축기(A-10005)를 이용하여 methanol을 제거하였다. 시료는 질소를 충전한 뒤 사용 전까지 냉동(-20°C) 보관하면서 분석을 위하여 사용하였다.

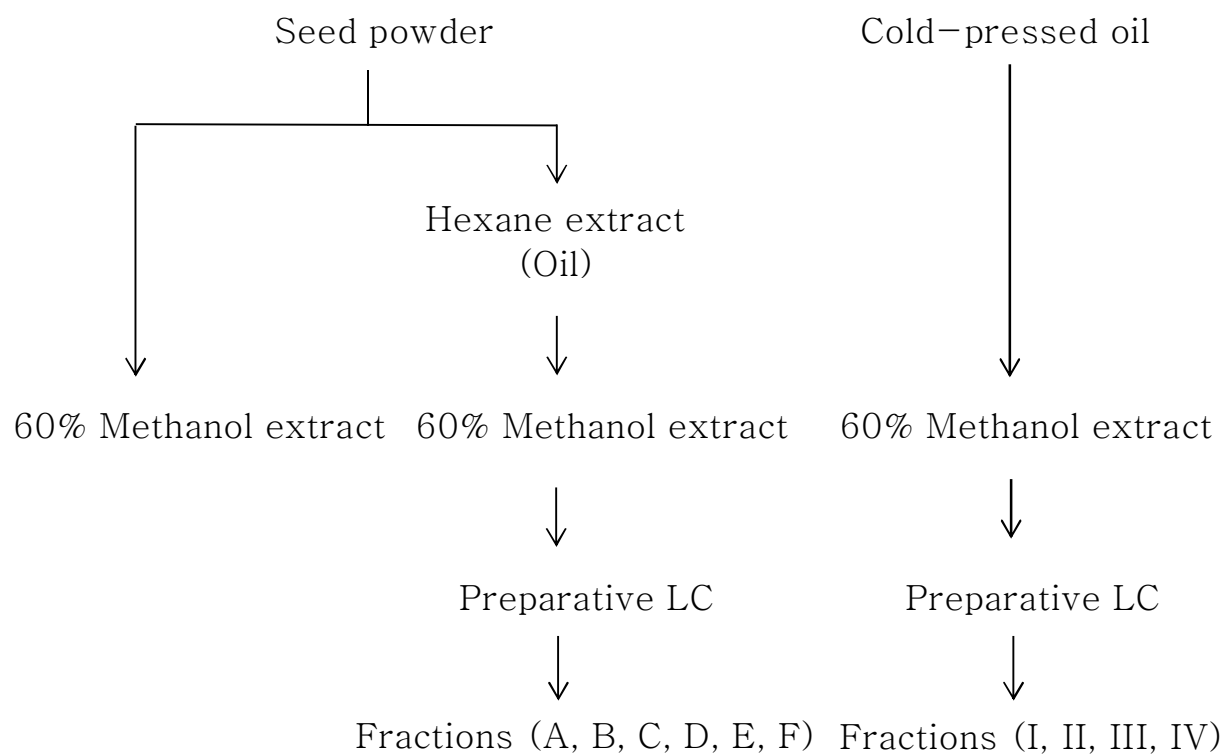


Fig. 1. Flowchart of extraction process

4.3. 유자씨 유지로부터 메탄올 가용물질 추출

유자씨 유지의 메탄올 가용물질 추출은 Fig. 1과 같이 진행하였다. 유자씨 유지의 총 추출물의 추출을 Tsimidou 등(1991)의 방법을 변형하여 진행하였다. 유자씨 유지 15 g에 15 mL의 hexane을 가해 용해시킨 후, 60% methanol(Samchun Chemical Co.) 9 mL를 가하여 상온에서 1시간 10분 동안 stirrer(MSH-20D)를 이용하여 400 rpm으로 교반추출하였다. Separatory funnel에 옮겨 30분간 정치시켜 둔 후, methanol 층만을 취하고, hexane 층을 위의 과정을 2번 더 반복하여 추출하였다. 이 추출물을 모아 45 mL의 hexane을 가하여 1시간 10분간 교반하였다. Separatory funnel에 옮겨 30분간 정치시켜 둔 후, methanol 층만을 깔때기와 Whatman No. 1 filter paper(Whatman International Ltd.)를 이용하여 여과하였다. 이 후 40°C에서 감압농축기(A-10005)를 이용하여 methanol을 제거하였다. 시료는 질소를 충전한 뒤 사용 전까지 냉동(-20°C) 보관하면서 분석을 위하여 사용하였다.

4.4. 유자씨 유지 추출물의 분획

유자씨 유지로부터 메탄올 가용 추출물을 UV detector(UV detector 310, JAI, Tokyo, Japan)가 장착된 preparative LC(LC-9201, Hitachi Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 분획하였다. 시료는 60% 메탄올에 녹여 0.45 μ m filter(Pall, NY, USA)에 통과시켜 준비하였으며, 주입량은 3 mL였다. 컬럼은 JAIGEL-GS310(21.5 mm x 500 mm, GFC and C₁₈, 1015 μ m, JAI, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 유속은 4 mL/min으로 유지하였고, 210 nm를 검출파장으로 하여 측정하였다. 헥산 추출 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 분획물은 11-18분, 18-27분, 27-47분, 47-63분, 63-77분, 94-112분에 획득하여 각각 분획물 A-F로 명명하였다. 냉압착 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 분획물은 13-19분, 19-32분,

32-41분, 87-109분에 획득하여 각각 분획물 I-IV로 명명하였다.

4.5. 유자씨 메탄올 가용 추출물로부터의 ichangensin 분획

유자씨의 메탄올 가용 추출물을 UV detector(JAI)가 장착된 preparative LC(Hitachi Inc.)를 이용하여 분획하였다. 시료는 60% 메탄올에 녹여 0.45 μ m filter(Pall, NY, USA)에 통과시켜 준비하였으며, 주입량은 3 mL였다. 컬럼은 YMC-Pack ODS-A(10.0 mm x 250 mm, C18, 5 μ m, JAI, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 유속은 4 mL/min으로 유지하였고, 210 nm를 검출과장으로 하여 측정하였다. 분획은 두 단계를 거쳐 진행하였다. 첫 번째 단계에서는 isocratic 조건(acetonitrile/중류수=40:60 (v/v)) 하에서 유자씨 메탄올 가용 추출물로부터 34-41분에 nomilin과 ichangensin의 혼합물을 분획하였다. 획득한 분획물을 100% 메탄올에 녹여 100 mg/mL의 농도로 만들었다. 두번째 단계에서는 recycle 기술을 이용하여 샘플을 다시 컬럼으로 주입시켜 계속적으로 분리하였다. 첫번째 단계의 분획물로 isocratic 조건(acetonitrile:중류수=45:55 (v/v)) 하에서 210분 동안 recycle한 후, 220-235분에 ichangensin을 분획하였다.

5. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 HPLC를 이용한 limonin과 nomilin의 정량 분석

유자씨와 유자씨 유지 총 추출물의 조성을 확인하기 위하여 HPLC 분석을 수행하였다. Ultimate 3000 HPLC system(Dionex Corporation, Sunnyvale, USA)을 이용하였다. 시료를 60% 메탄올에 녹여 2.0 mg/mL(유자씨 추출물), 0.067 mg/mL(헥산 추출 유자씨 유지 추출물), 0.16 mg/mL(냉압착 유자씨 유지 추출물) 농도로 제조하여 0.45 μ m filter에 통과시켜 준비하였다. 이동상은 3 mM phosphoric acid 수용액(용매 A)와 acetonitrile(용매 B)이었다. 용매의

gradient는 0~5분, 용매 A 85~77%; 5~25분, 용매 A 77~74%; 25~50분, 용매 A 74~65%; 50~65분, 용매 A 65%로 하였다. 210 nm에서 측정하였다. Inject volume은 20 μ L였고, flow rate는 1.0 mL/min이었다. 컬럼은 Nova-Pak C18 column(300 x 3.9 mm I.D., 4 μ m, Waters, Milford, MA, USA)을 이용하였다.

6. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물과 분획물의 HPLC-ESI-MS 분석

유자씨와 유자씨 유지 총 추출물과 분획물의 조성을 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행하였다. Surveyor LC system(Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)에 장착된 LCQ Deca XP plus(Thermo Scientific)를 이용하였고, capillary temperature는 275°C, capillary voltage는 15V, spray voltage는 5 kV였다. 시료는 60% 메탄올에 녹여 0.45 μ m filter에 통과시켜 준비하였다. 이동상은 0.1% formic acid 수용액(용매 A)과 0.1% formic acid/acetonitrile(용매 B)이었다. 용매의 gradient는 0~5분, 용매 A 85~77%; 5~25분, 용매 A 77~74%; 25~50분, 용매 A 74~65%; 50~55분, 용매 A 65%로 하였다. 210 nm에서 측정하였다. Inject volume은 5 μ L였고, flow rate는 200 μ L/min이었다. 질량 분석은 ESI positive와 negative mode를 사용하였으며, mass spectrum은 50 - 2000 m/z atomic mass units에서 확인하였다. 컬럼은 Thermo Hypersil Gold column(2.1 mm \times 50 mm, 1.9 μ m, Bellefonte, PA, USA)을 이용하였다. 분석에 사용한 column 종류, 용매, 용매 gradient 등은 정량분석시의 analytical HPLC의 조건과 동일하였으나, A 용매에 phosphoric acid 대신 formic acid를 가하여 사용하였다.

7. 세포배양

본 연구에 사용한 human colon adenocarcinoma cell인 HT-29 세포는

한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 본 연구실에서 계대배양하여 5~20 사이의 passage의 세포를 이용하였다. 세포 밀도가 높아지면 trypsin-EDTA(Gibco Laboratories, Grand Island, NY)를 5분간 처리하여 계대배양하였다. HT-29 세포는 RPMI(Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco)와 1% penicillin/streptomycin(Gibco)을 첨가한 배지를 사용하여 5% CO₂를 유지되는 37°C의 배양기에서 배양하였다.

8. 생장 억제 효과 측정

암세포에 대한 추출물의 암세포 생장 억제 효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 Jeong 등(2010)의 방법을 참고하여 실험하였다. HT-29 세포를 1×10^5 cells/well 농도로 100 μ L를 96 well, flat-bottom plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 24시간 배양하였다. 그리고 배양에 사용되었던 배지를 제거하고, 배지에 일정 농도로 희석한 시료를 100 μ L씩 넣어 다시 24시간과 48시간 동안 배양하였다. 시료가 들어있는 배지를 제거하고 10 μ L 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma Chemical Co.)와 100 μ L 무혈청 배지를 분주한 다음, 2시간 동안 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거한 다음, dimethyl sulfoxide(DMSO; Samchun Chemical Co.) 100 μ L를 가하여 상온에서 20분 동안 발색시켰다. Spectrophotometer(Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm와 620 nm에서 흡광도를 측정하고 이 차를 이용하여 cell viability(%)를 산출하였다. 대조군의 cell viability와 시료를 첨가한 군의 cell viability를 비교하여 시료의 생장 억제 효과를 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times (\text{시료를 처리한 군의 흡광도}) / (\text{대조군의 흡광도})$$

9. 통계분석

연구 결과는 SPSS program (Version 20.0; Chicago, IL, USA)을 이용하여 t-test 또는 one-way ANOVA를 실시하였다. ANOVA 통계 분석 결과에서 유의성이 있을 경우에는 Duncan의 다중 범위 시험법 (Duncan's multiple range test)을 이용하여 통계적 유의성을 검토하였다 ($P < 0.05$).

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 유자씨의 수분 및 조지방 함량

유자씨에 수분함량은 7.1 ± 0.3 (% , w/w)이었으며, 조지방 함량은 28.3 ± 0.4 (% , w/w)이었다. 이는 경상남도 남해군 유자씨의 수분이 7.23%이고, 조지방이 35.29%인 것으로 보고한 결과(권오천 등, 2006)와 비교하였을 때, 수분 함량은 유사하였으나, 조지방 함량은 조금 낮았다. 이는 생산지나 생산 환경 등의 다양한 요인 때문인 것으로 보인다. 200 ± 0.9 g의 건조 유자씨 당 35.7 ± 2.9 g의 헥산 추출 유자씨 유지를 생산할 수 있었으므로, Soxhlet 추출법을 이용했을 때를 100(% , w/w, dry base)으로 보았을 때, 헥산 추출 유자씨 유지의 수율은 63.1 ± 4.8 (% , w/w, dry base)였다. Soxhlet 추출법을 이용했을 때보다 헥산 추출 유자씨 유지의 수율이 낮은 이유는 헥산 추출시 열로 인한 유자씨 내의 유효성분의 손실을 최소화하기 위해 교반추출 방법을 이용하였기 때문으로 보인다.

2. 유자씨 유지의 지방산 조성

냉압착 유자씨 유지와 헥산 추출 유자씨 유지의 지방산 조성을 gas chromatography로 분석한 결과, Table 1과 같이 palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, ALA가 확인되었다. 유자씨 유지의 지방산은 냉압착 유자씨 유지와 헥산 추출 유자씨 유지 간에 약간의 차이는 있었으나, 지방산 조성은 모두 linoleic > oleic > palmitic > stearic > ALA > palmitoleic의 순으로 많이 함유되어 있었다.

본 연구의 냉압착 유자씨 유지의 지방산 조성 결과를 이 등(2006)의 경상남도 남해산 유자씨 압착유의 지방산 조성 분석 결과인 palmitic acid 16.45%, stearic acid 10.98%, oleic acid 27.68%, linoleic acid 32.99%, ALA 1.53%, arachidonic

Table 1. Fatty acid composition of yuja seed oils

(unit: %, w/w)		
Fatty acid	Hexane-extracted oil	Cold-pressed oil
Palmitic acid (16:0)	19.5±0.6	18.2±0.4
Palmitoleic acid (16:1)	0.6±0.0	0.6±0.0
Stearic acid (18:0)	8.3±0.6	7.5±0.3
Oleic acid (18:1)	31.5±0.2	30.4±0.1
Linoleic acid (18:2)	35.6±1.1	33.2±0.6
ALA (18:3)	1.4±1.2	1.9±0.0

acid 0.29%와 비교해 보았을 때 비슷하였으나, 본 연구에서는 oleic acid의 비율이 약간 높고, stearic acid의 비율이 약간 낮았다. 한편 헥산 추출 유자씨 유지의 경우 서 등(2002)의 전라남도 완도산 유자씨 연구의 결과인 palmitic acid 21.49~22.92%, palmitoleic acid 1.78~2.22%, stearic acid 5.12~5.43%, oleic acid 34.42~34.77%, linoleic acid 31.72~32.45%, ALA 3.24~3.41%와 비교하였을 때, 본 실험결과의 비율이 palmitic acid, palmitoleic acid, ALA가 상대적으로 약간 더 낮았고, stearic acid, oleic acid, linoleic acid는 약간 더 높았다.

대두유의 지방산 조성결과가 palmitic acid 11.9%, stearic acid 4.15%, oleic acid 25.8%, linoleic acid 51.1%, ALA 5.96%인 것(Farhoosh 등, 2009)과 비교해 볼 때, 유자씨 유지에 가장 많은 비율을 차지하는 지방산이 linoleic acid이며, 그 다음으로 많은 지방산이 oleic acid, palmitic acid 순이라는 점을 볼 때 유자씨 유지가 대두유의 지방산 조성과 유사함을 알 수 있다. 그러나 대두유에 비하여

유자씨 유지의 linoleic acid의 비율은 낮고 oleic acid, palmitic acid, ALA의 비율은 높았다. 그리고 대두유에서 거의 검출되지 않은 palmitoleic acid가 유자씨 유지에는 존재하였다. 그리고 불포화지방산의 비율은 냉압착 유자씨 유지와 헥산 추출 유자씨 유지에서 각각 66.1%와 69.1%였는데, 대두유의 연구 결과인 82.86%와 약간의 차이를 보였으나, 전반적으로 대두유의 지방산 조성 비율과 유사하여 식용 유지로서의 활용 가능성이 있음을 알 수 있다.

식용유로 이용되는 카놀라유의 지방산 조성은 palmitic acid 4.77%, palmitoleic acid 0.39%, stearic acid 2.61%, oleic acid 62.4%, linoleic acid 19.2%, ALA 7.02% 이다(Farhoosh 등, 2009). 이것과 비교해 볼 때, 유자씨 유지에서 palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid와 linoleic acid의 비율이 더 높으며, oleic acid와 ALA의 비율은 더 낮았다.

3. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 limonin과 nomilin의 함량

유자씨 추출물에는 limonin과 nomilin이 각각 111.4 ± 15.2 와 103.4 ± 6.5 mg/100 g dry seed이 존재하였고, 냉압착 유지 추출물에는 각각 52.2 ± 3.4 와 93.0 ± 7.3 mg/100 g oil이 존재하였으나, 헥산 추출 유지 추출물에서는 거의 검출되지 않았다. 이전 연구에서 유자씨 메탄올 추출물 내에 limonin과 nomilin이 각각 140.34와 41.40 mg/100 g dry seed이 함유되어 있다는 결과(우 등, 2006)와 비교하여 보았을 때, 본 연구에서의 유자씨의 limonin과 nomilin의 함량이 약간 더 많았다.

4. 유자씨와 유자씨 유지의 추출물의 조성

유자씨와 유자씨 유지 추출물의 조성을 HPLC-ESI-MS로 확인하였고, 그 결과는 Fig. 2와 Table 2와 같다. 본 연구의 positive ion mode와 negative ion

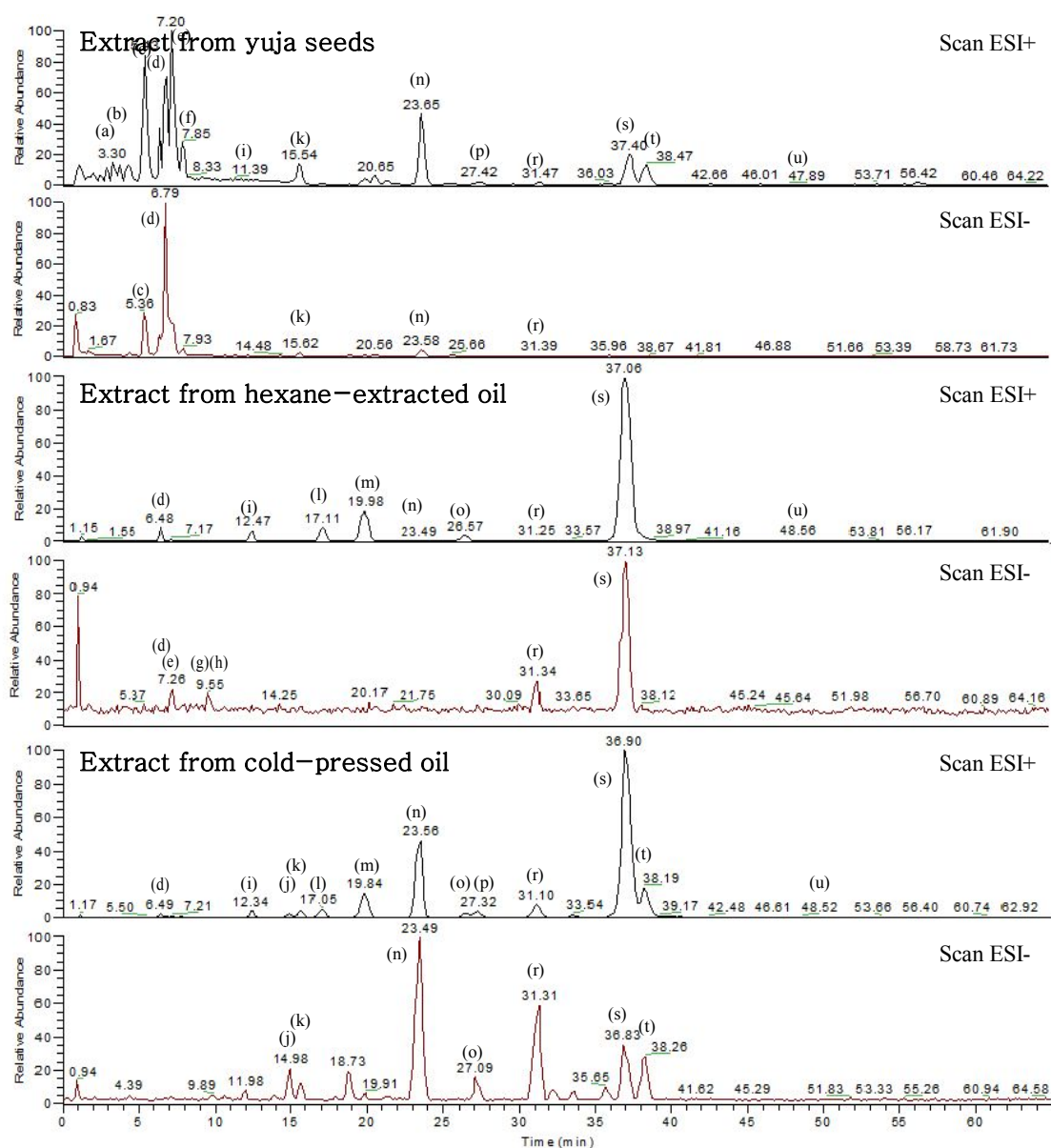


Fig. 2. HPLC-ESI-MS chromatograms of the extracts of yuja seeds and yuja seed oils

(a) limonin glucoside; (b) deacetyl nomilinic acid glucoside; (c) isoobacunoic acid glucoside and deoxylimonol; (d) heptadecyl methoxybenzoate; (e) nomilin glucoside; (f) obacunone glucoside; (g) unidentified; (h) unidentified; (i) unidentified; (j) xanthotoxin; (k) unidentified; (l) unidentified; (m) isopimpinellin, bergepten; (n) isoobacunoic acid; (o) byakangelicin; (p) limonin; (q) unidentified; (r) calamin; (s) ichangensin; (t) nomilin; and (u) unidentified.

Table 2. Identification of HPLC–ESI–MS peaks for yuja seeds and yuja seed oils

Peak no.	MS data		Identification
	Positive ion mode	Negative ion mode	
a	–	668.1, 694.9, 993.3	Limonin glucoside
b	–	669.4	Deacetyl nomilinic acid glucoside
c	530.1	651	Isoobacunoic acid glucoside, deoxylimonol
d	391.1, 152.1, 134.2	–	Heptadecyl methoxybenzoate
e	152.1	693	Nomilin glucoside
f	–	633.4	Obacunone glucoside
g	642	669.0	–
h	642	668.8	–
i	642	668	–
j	217.2	–	Xanthotoxin
k	–	–	–
l	–	–	–
m	247.2, 217.3	–	Isopimpinellin, bergapten
n	473	–	Isoobacunoic acid
o	333.9, 231.1	–	Byakangelicin
p	471.2	–	Limonin
q	798	779	–
r	522	549.1	Calamin
s	445, 462	531	Ichangensin
t	515.2	–	Nomilin
u	–	–	–

Peak numbers refer to Fig. 1.

mode의 결과를 이전 연구의 HPLC-MS 결과와 비교하였다(Vikram 등, 2011; Frérot 등, 2004; Zheng 등, 2010; Peroutka 등, 2007; Johnson 등, 2013; Manners 등, 2004; Jayaprakash 등, 2011). 유자씨 추출물 내에서는 비교적 더 극성인 limonin glucoside, deacetyl nomilinic acid glucoside, isoobacunoic acid glucoside 등과 같은 limonoid glycoside가 주로 발견되었고, 유자씨 유지 추출물 내에서는 비교적 비극성인 aglycone이 주로 발견되었다. 유자씨 유지 추출물에서 limonoid glycoside가 상대적으로 적은 비율로 검출된 점으로 미루어볼 때, 이 물질들은 착유하는 과정에서 적게 용출되어 나오는 것으로 보인다.

5. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 암세포 성장 억제 효과

HT-29 세포에 유자씨 추출물, 유자씨 유지 추출물, limonin, nomilin을 일정 농도로 첨가하여 배양한 후, MTT assay로 확인한 암세포 성장 억제 효과는 Fig. 3와 같다. 유자씨 유지의 추출물은 암세포 성장 억제 효과가 확인되었다. 10, 30, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 추출물을 처리한 결과, 24시간 배양후 150 $\mu\text{g/mL}$ 에서 48시간 배양후 100, 150 $\mu\text{g/mL}$ 에서 암세포 생장이 유의적으로 억제되었다($P<0.05$). 24시간 배양후 냉압착 유자씨 유지 추출물의 IC_{50} 는 0.182 mg/mL이었고, 헥산 추출 유자씨 유지 추출물의 IC_{50} 는 0.176 mg/mL이었다. 48시간 배양후에는 냉압착 유자씨 유지 추출물의 IC_{50} 가 0.114 mg/mL이었고, 헥산 추출 유자씨 유지 추출물의 IC_{50} 는 0.116 mg/mL이었다. IC_{50} 는 24시간보다 48시간 처리시 더 낮은 값을 보였다.

그러나 유자씨 추출물, limonin, nomilin은 유의적인 암세포 성장 억제 효과를 보이지 않았다($P>0.05$). 본 연구의 결과는 이전 연구에서 인간 대장암세포(HCT-116)에 대한 유자씨 헥산 추출물과 에탄올 추출물의 성장 억제 효과를 확인한 결과와 유사하다. 유자씨 헥산 추출물과 에탄올 추출물을 HCT-116 세포에

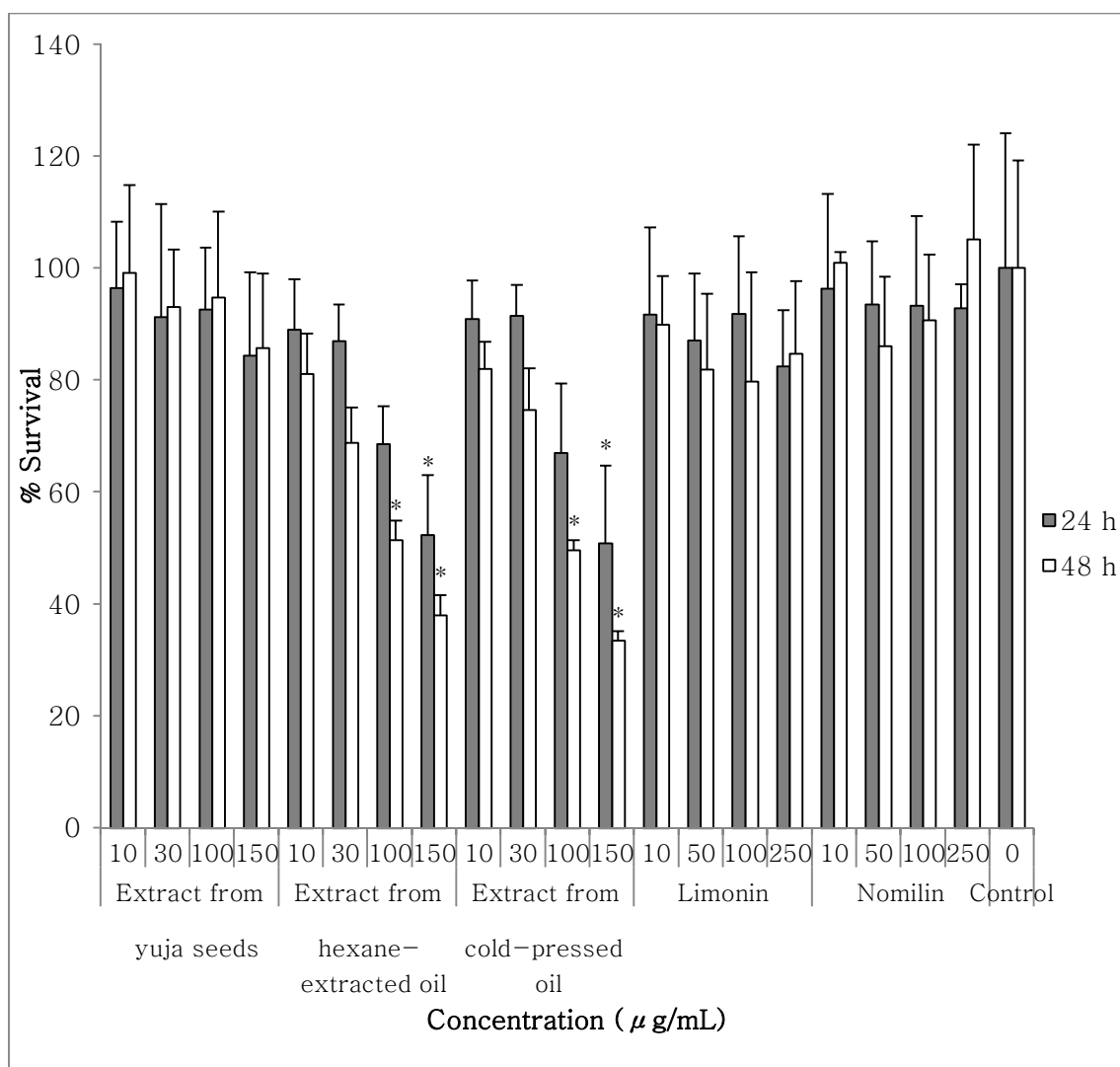


Fig. 3. Viability of HT-29 cells treated with the extracts of yuja seeds and yuja seed oils, limonin, and nomilin for 24 and 48 h

Values represent mean \pm standard deviation (n=3).

***, ** significantly different from the control (*<0.05, **<0.01, ***<0.001; t-test).

고농도(5 mg/mL)로 처리하였을 때에는 생장 억제 효과를 보였으나, 본 연구에서 처리한 것과 같은 농도에서는 생장 억제 효과를 보이지 못했다(이 등, 2009).

Poulose 등(2006)은 limonin과 nomilin이 인간 대장암(Caco-2) 세포와 인간 신경아세포종(SH-SY5Y) 세포의 생장 억제 효과를 보였다고 보고하였다. Limonin과 nomilin은 SH-SY5Y 세포의 생존율을 감소시켰을 뿐 아니라, caspase 3/7 활성을 증가시켰다. 이와 같은 이전 연구를 바탕으로 limonin과 nomilin의 HT-29 세포에 생장 억제 효과를 확인하였으나, 본 연구에서는 limonin과 nomilin의 모든 농도에서 HT-29 세포의 생장을 억제하지 못하였다. 따라서 유자씨 유지 내에 존재하는 limonin과 nomilin 외의 다른 물질들이 유자씨 유지 추출물의 암세포 생장 억제 효과의 주요 원인일 것으로 보인다.

6. 유자씨와 유자씨 유지의 메탄올 추출물의 분획물의 암세포 생장 억제 효과

유자씨 유지 추출물내의 암세포 생장 억제 효과를 보이는 성분을 확인하기 위하여, preparative LC를 이용하여 획득한 유자씨 유지 추출물의 분획물을 HT-29 세포에 처리하여 생장 억제 효과를 MTT assay로 확인하였다. 그 결과, Fig. 4와 같이 헥산 추출 유자씨 유지 추출물로부터의 여섯 개의 분획물(A-F)과 냉압착 유자씨 유지 추출물로부터의 네 개의 분획물(I-IV) 중에서 다섯 개의 분획물(C, E, F, III, IV)만이 생장 억제 효과를 나타내었다. 이 다섯 개의 분획물을 10, 30, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리한 MTT assay 결과와 IC₅₀은 Fig. 4와 같다. 이 다섯 개의 분획물 중에서 24시간과 48시간 처리 후 분획물 C와 F가 암세포 생장을 가장 크게 억제하였다.

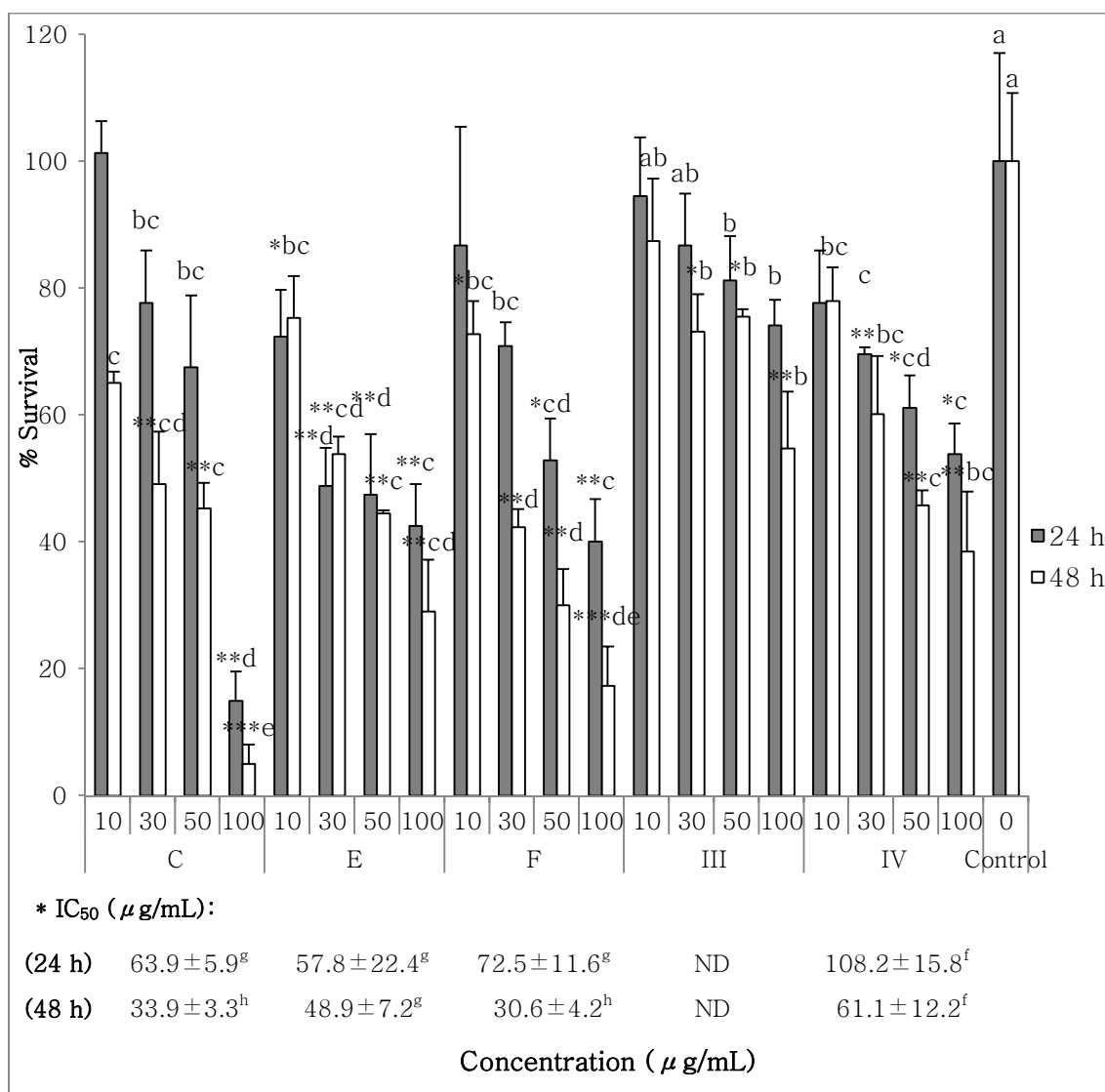


Fig. 4. Viability of HT-29 cells treated with the fractions from yuja seed oils for 24 h and 48 h

Values represent mean \pm standard deviation (n=3).

***, ** Significantly different from the control (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001; t-test).

a,b,c,d,e Values with different superscripts in the same concentrations are significantly different ($P < 0.05$; one-way repeated of variance and Duncan's multiple range test).

f,g,h Values with different superscripts in the same row are significantly different ($P < 0.05$; one-way repeated of variance and Duncan's multiple range test).

Fractions of methanol extract from hexane-extracted oil: C (27–47 min), E (63–77 min), and F (94–112 min); and fractions of methanol extract from cold-pressed oil: III (32–41 min) and IV (87–109 min)

IC₅₀: concentration of the fraction required to 50% of survivability of cells

7. 유자씨와 유자씨 유지 메탄올 추출물의 분획물의 분석

유자씨 유지 추출물로부터 획득한 분획물 중에서 암세포생장 억제 효과가 있는 분획물들의 HPLC-ESI-MS 결과는 Fig. 5, Fig. 6, Table 3와 같다.

분획물 C의 MS chromatogram에서 6.42분의 retention time에서 391 m/z와 152.1 m/z가 주요한 ion으로 검출되었다. National Institute of Standards and Technology (NIST)의 mass spectral database (NIST Libraries and Structures version 2.0)와 비교하였을 때, heptadecyl methoxybenzoate가 391 m/z와 일치하였다. 그리고 heptadecyl alcohol이 떨어져 나간 fragment로서 152.1 m/z의 ion이 확인되었다. 또한, 152.1 m/z의 methoxybenzoic acid로부터 hydroxyl group이 하나 떨어져나간 134.2 m/z의 fragment를 확인할 수 있었으며, 이것은 ester bond를 형성할 수 있게 하는 methoxybenzoic acid의 carboxyl group의 존재와 연관이 깊다. 그 외에도 23분-24분에 473.1 m/z의 ion을 보이는 물질이 확인되며, 이는 이전 연구와 비교해볼 때, isoobacunoic acid로 추정된다(Vikram 등, 2011). 그 외에도 23분-24분에 473.1 m/z의 ion을 보이는 물질이 확인되며, 이는 이전 연구와 비교해볼 때, isoobacunoic acid로 추정된다(Vikram 등, 2011).

분획물 E에서는 12.26분에서 217.2 m/z의 주요한 ion이 검출되었다. 이는 Frérot 등(2004)과 Zheng 등(2010)의 HPLC-MS를 이용한 이전 연구 결과에서의 xanthotoxin의 base peak와 일치하였다. 그리고 12.16분에서의 UV/vis spectrum을 이전 연구의 xanthotoxin의 UV spectrum과 비교하였을 때 매우 유사하였다(Frérot 등, 2004). 본 연구에서의 12.16분의 물질의 최대 UV 흡수 파장이 249.0와 301.0 nm이었으며, 이전 연구에서의 최대 UV 흡수 파장은 218, 248, 302.0 nm로 매우 유사하였다. Xanthotoxin은 bergapten과 isopimlinellin이 속해있는 furocoumarin의 일종이다. Xanthotoxin은 *Citrus grandis*의 껍질(Gyawali 등, 2012)과 *Citrus sinensis*의 껍질과 잎(Shalaby 등,

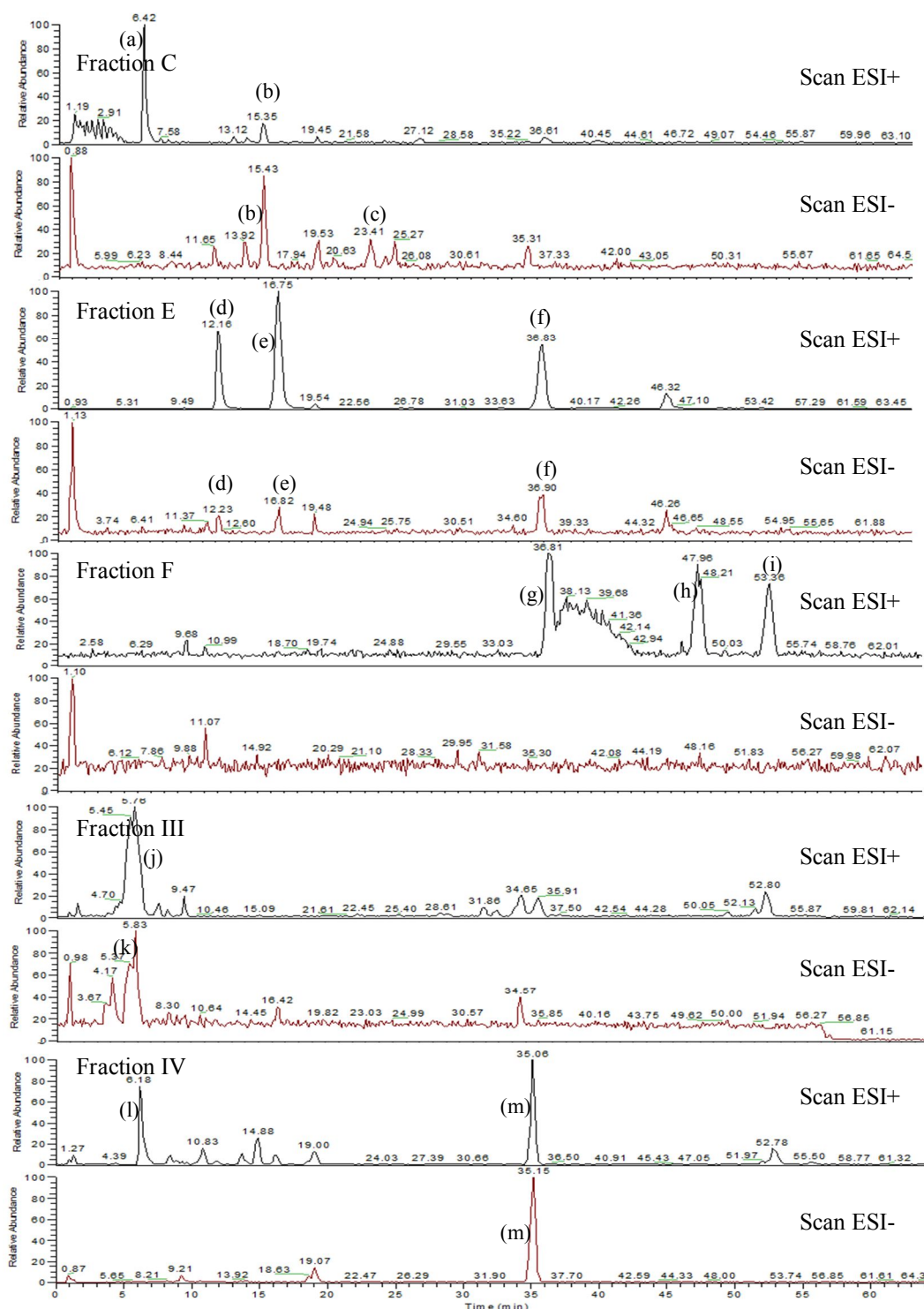


Fig. 5. HPLC–ESI–MS chromatograms of fractions from yuja seed oils

Fractions of methanol extract from hexane–extracted oil: C (27–47 min), E (63–77 min), and F (94–112 min); and fractions of methanol extract from cold–pressed oil: III (32–41 min) and IV (87–109 min)

(a) heptadecyl methoxybenzoate; (b) isoobacunoic acid; (c) unidentified; (d) bergaptene; (e) isopimpinellin; (f) ichangensin; (g) ichangensin; (h) unidentified; (i) unidentified; (j) deoxylimonol; (k) unidentified; (l) heptadecyl methoxybenzoate; and (m) unidentified
Peak numbers refer to Fig. 6.

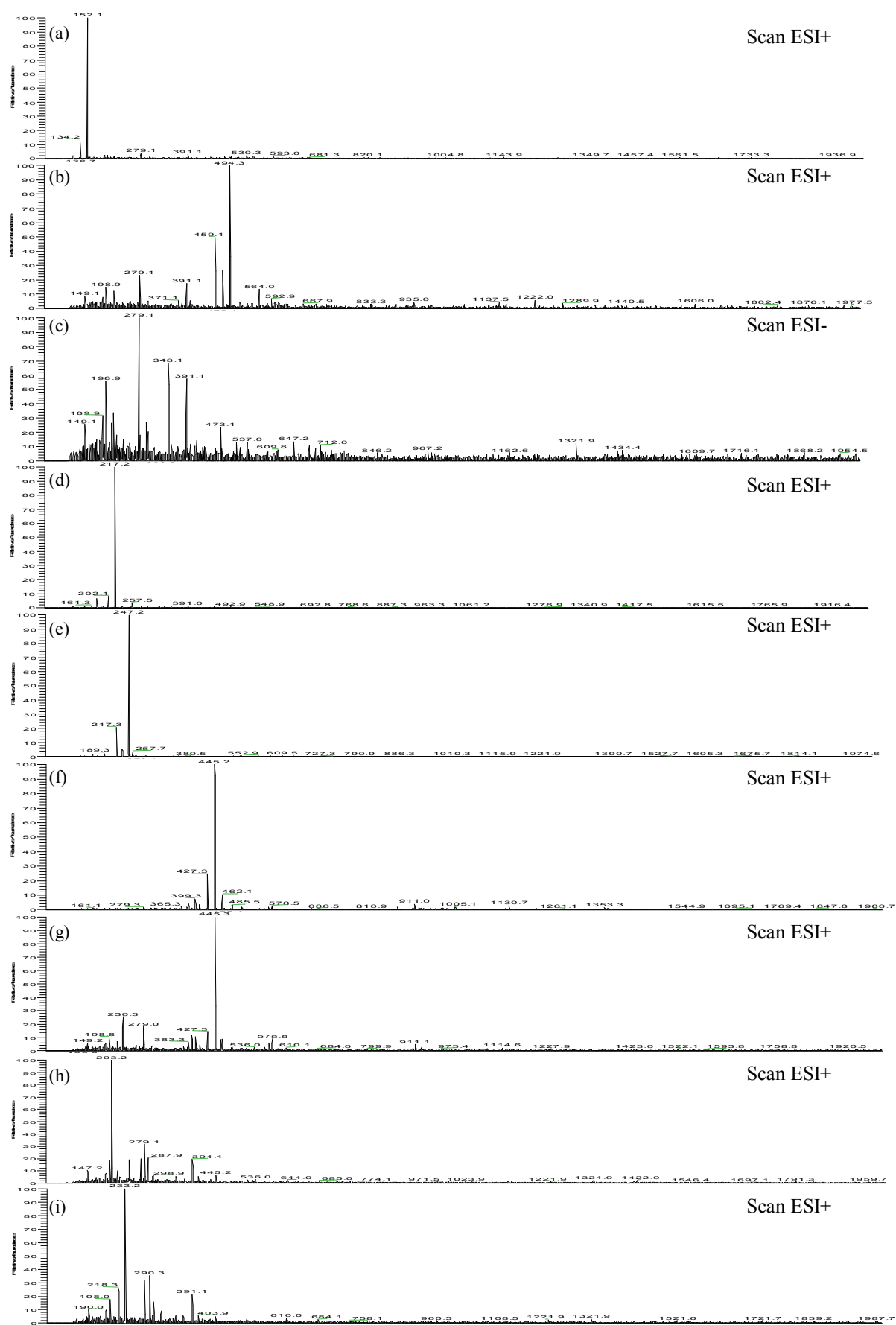


Fig. 6. (Continued)

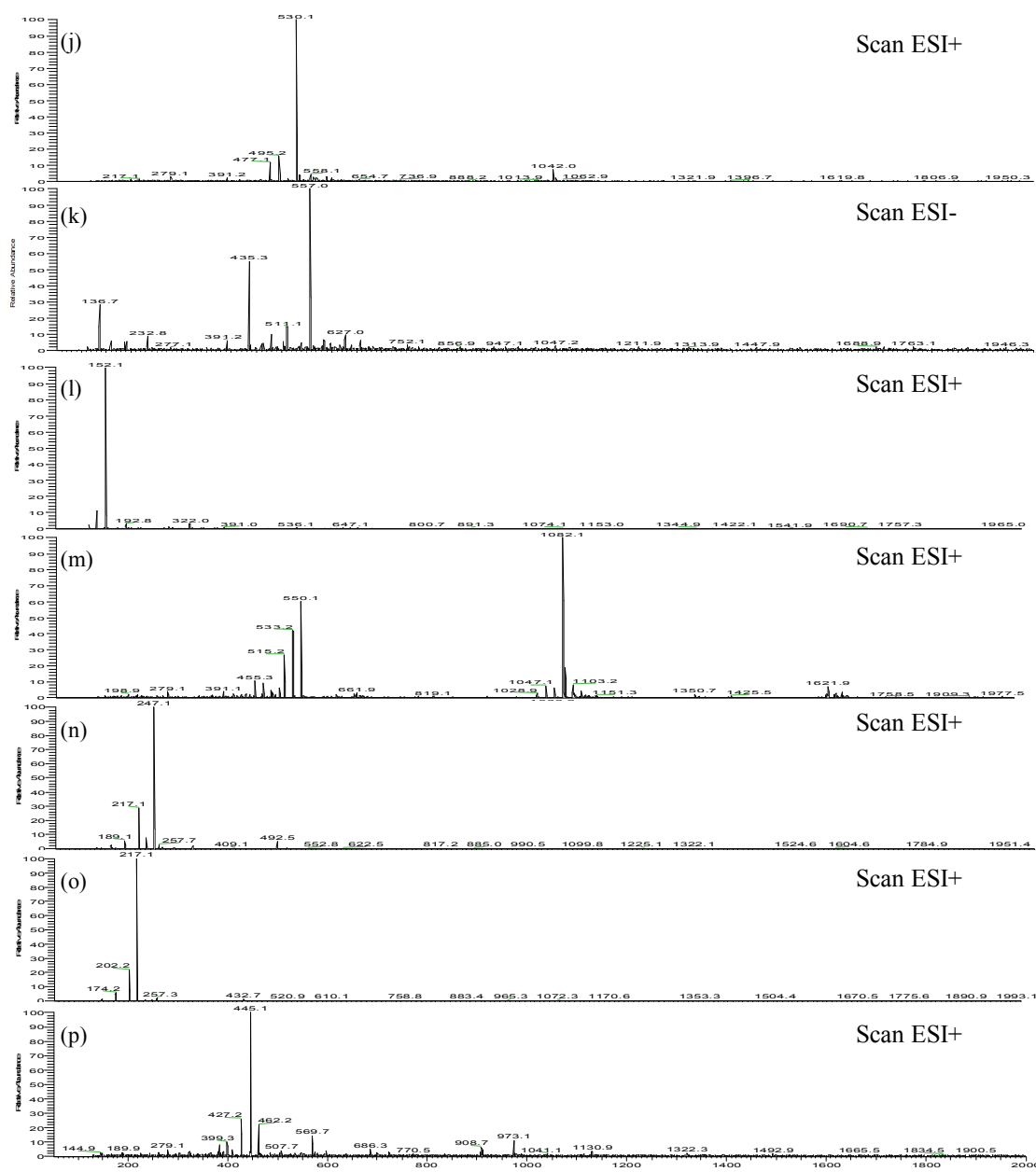


Fig. 6. Mass spectra of fractions from yuja seed oils, isopimpinellin, bergapten and ichangensin

Fractions of methanol extract from hexane-extracted oil: C (27–47 min), E (63–77 min), and F (94–112 min); and fractions of methanol extract from cold-pressed oil: III (32–41 min) and IV (87–109 min)

Fraction C: (a) (5.93–6.42 min), (b) (14.54–15.51 min), (c) (23.00–23.98 min); fraction E: (d) (11.54–12.79 min), (e) (6.37–17.00 min), (f) (36.01–36.98 min); fraction F: (g) (36.05–37.48 min), (h) (47.56–49.45 min), (i) (53.10–54.47 min); fraction III: (j) (4.98–6.52 min) and (k) (5.06–6.46 min); fraction IV: (l) (5.94–6.31 min), and (m) (34.07–35.99 min); isopimpinellin: (n) (16.49–16.99 min); bergapten: (o) (16.62–17.12 min); and ichangensin: (p) (36.22–37.11 min)

Table 3. Identification of the HPLC–ESI–MS peaks for the fractions from yuja seed oils

Fraction	Peak no.	MS data(retention time)		Identification
		positive ion mode	negative ion mode	
C	a	391.1, 152.1, 134.2 (6.4 min)	–	Heptadecyl methoxybenzoate
	b	494.3 (15.4 min)	–	Isoobacunoic acid
	c	–	279.1 (23.4 min)	Unidentified
E	d	217.2 (12.2 min)	–	Xanthotoxin
	e	247.2, 217.3 (16.8 min)	–	Isopimpinellin, bergapten
	f	445.2 (36.6 min)	–	Ichangensin
F	g	445.3 (36.8 min)	–	Ichangensin,
	h	203.2 (48.0 min)	–	Unidentified,
	i	233.2 (53.4 min)	–	Unidentified,
III	j	530.1 (5.8 min)	–	Deoxyylimonol,
	k	–	557.0 (5.8 min)	Unidentified
IV	l	391.0, 152.1, 134.2 (6.2 min)	–	Heptadecyl methoxybenzoate
	m	550.1 (35.1 min)	–	Unidentified

Fractions of methanol extract from hexane–extracted oil: C (27–47 min), E (63–77 min), and F (94–112 min); and fractions of methanol extract from cold–pressed oil: III (32–41 min) and IV (87–109 min)

2011)에서 발견되었다는 보고가 있다. Xanthotoxin은 Um 등(2010)의 연구에서 인간 대장암세포(HT-29)의 성장을 농도 의존적으로 유의적으로 억제한다고 보고된 바 있다. 또한, xanthotoxin은 인간 위암세포(AGS), 인간 섬유육종세포(HT1080), 인간 백혈병세포(U937)에 대한 성장 억제 효과를 보였다고 보고된 바 있다(Kong 등, 2010).

분획물 E에서 주요물질이 16.75분에 247.2 m/z와 217.2 m/z로 검출되었는데, Peroutka 등(2007)과 Johnson 등(2013)의 이전 연구와 비교해볼 때, 각각 isopimpinellin과 bergapten으로 추정된다. 본 연구에서 16.75분에 247.1 m/z가 검출되었으며, 이로부터 methoxy group이 떨어진 fragment인 217 m/z가 검출되었는데, 이와 같은 결과는 본 연구에서의 isopimpinellin 단일물질의 MS 결과와 일치하였다. 이것은 또한 Johnson 등(2013)과 Zheng 등(2010)의 HPLC-ESI-MS 결과와도 일치한다. 또한, 분획물 E의 16.75분의 최대 UV 흡수파장은 248.0, 266.0, 313.0 nm였으며, isopimpinellin 단일물질은 249.0, 265.0, 312.0 nm였고, Frerot 등(2004)의 연구 결과에서는 223, 269, 314 nm으로 서로 매우 유사하였다. Isopimpinellin은 citrus 내에 존재하는 furanocoumarin의 일종으로, Dugrand 등(2013)의 이전 연구에서 isopimpinellin이 bergamot, lemon, grapefruit, mandarin, tangerine, bitter orange의 유지에 존재한다고 보고하였다.

분획물 E에서 16.75분에 217.2 m/z가 검출되었는데, 이는 bergapten의 base peak로 추정된다. 이 MS 결과는 bergapten 단일물질의 결과와 일치하며, Johnson 등(2013), Zheng 등(2010), Zhang 등(2011)의 연구에서 HPLC-ESI-MS 결과와도 일치한다. Bergapten은 Citrus 내에 존재하는 furanocoumarin의 일종이며, Dugrand 등(2013)은 bergapten이 bergamot, lemon, grapefruit, mandarin, tangerine, bitter orange의 유지에 존재한다고 보고하였다.

분획물 E에서 또 다른 주요물질이 36.63분에 445.2 m/z로 검출되었으며, Manners 등(2004)의 이전 연구의 MS 결과와 비교해볼 때, ichangensin으로 추정된다. 또한 본 연구에서 36.63분에 427.3 m/z로 검출되었으며, 이는 ichangensin으로부터 물 분자 하나가 떨어진 fragment의 ion으로 추정된다. Herman 등(1992)과 Hu-hua 등(1996)은 유자씨 내에서 ichangensin을 발견하였으며, 유자씨에 229 $\mu\text{g/g}$ fresh weight of seeds의 농도로 존재한다고 보고하였다(Hu-hua 등, 1996).

분획물 F에서 주요물질이 36.81분에 445.3 m/z로 검출되었으며, 이것은 Manners 등(2004)의 이전 연구의 MS 결과와 비교해볼 때, ichangensin으로 추정된다. 또한 분획물 F 내에서 세 개의 주요 ion이 37, 43, 48분에 459.3, 203.2, 233.2 m/z로 각각 검출되었다. ES로부터 분리한 ichangensin의 MS spectrum은 분획물 E와 F의 36분의 MS spectrum과 일치하였다. 가장 효과가 있는 분획물 중 하나인 분획물 E와 F의 주요 물질이 ichangensin이기 때문에, ichangensin은 암세포 성장 억제 효과의 주요 원인물질일 수 있다.

분획물 III에서 5과 6.5분 사이에 positive mode의 530.1 m/z와 negative mode의 557.0 m/z의 ion이 발견되었으며, 530.1 m/z의 ion은 Manners 등(2004)의 deoxylimonol의 MS 결과와 일치한다.

분획물 IV에서 6.18분에 391.0 m/z가 검출되었으며, NIST chemical webbook의 LC-MS 결과와 비교하였을 때 heptadecyl methoxybenzoate로 추정된다. Heptadecyl methoxybenzoate가 있는 분획물 C와 IV가 유의적인 암세포 성장 억제 효과를 보였으므로, 분획물 C와 IV의 암세포 성장 억제 효과는 heptadecyl methoxybenzoate에 기인한 것으로 추정된다. 그러나 heptadecyl methoxybenzoate의 암세포 성장 억제 효과에 대한 연구는 거의 없다. 그 외에도

분획물 IV에서는 35.06분에서 550.1 m/z의 ion이 검출되었다. 분획물 내에 있는 일부 다른 물질들은 citrus seed oil에 대한 이전 연구가 없어 확인할 수 없었다.

Heptadecyl methoxybenzoate와 ichangensin은 각각 분획물 C와 F에서 확인되었으며, ichangensin과 heptadecyl methoxybenzoate은 비교적 낮은 농도로 각각 분획물 E와 IV에서도 존재했다. 그러므로, 이러한 물질들이 HT-29 세포에 대한 유자씨 유지 추출물의 암세포 성장 억제 효과에 주요한 영향을 미치는 것으로 보인다. 추출물 내의 각각의 단일물질의 효과를 확인하기 위해서는 HT-29 세포에 처리하여 MTT-assay로 확인할 필요가 있다.

8. Isopimpinellin, bergapten, ichangensin의 암세포 성장 억제 효과

Ichangensin 단일물질을 HT-29 세포에 처리하여 MTT assay를 이용하여 암세포 성장 억제 효과를 확인하였다. Isopimpinellin, bergapten은 시판하는 것을 구입하여 사용하였으며, ichangensin은 유자씨 추출물로부터 preparative LC를 이용하여 분리하였다. 이 세가지 물질을 10, 30, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 MTT assay로 확인한 결과는 Fig. 7과 같다. Isopimpinellin, bergapten, ichangensin은 HT-29 세포의 성장을 농도 의존적으로 억제하였으나, isopimpinellin과 bergapten은 HT-29 세포의 성장을 억제하였으나 유의적이지는 않았다. 이러한 결과는 이전 연구에서 isopimpinellin과 bergapten이 암세포 성장을 어느 정도 억제시킨다는 보고와 일치한다. Um 등(2010)의 연구에 따르면, xanthotoxin, isopimpinellin, bergapten을 HT-29 세포에 처리하여 성장 억제 효과를 확인하였을 때, 농도 의존적으로 감소시켰으나 억제 활성은 xanthotoxin, isopimpinellin, bergapten의 순으로 높았다. 또한 Kong 등(2010)의 연구에 따르면, 인간 위암세포(AGS)에 처리하였을 때의 억제 활성은 xanthotoxin, bergapten, isopimpinellin의 순으로 높았고, 인간 섬유육종세포(HT1080)에

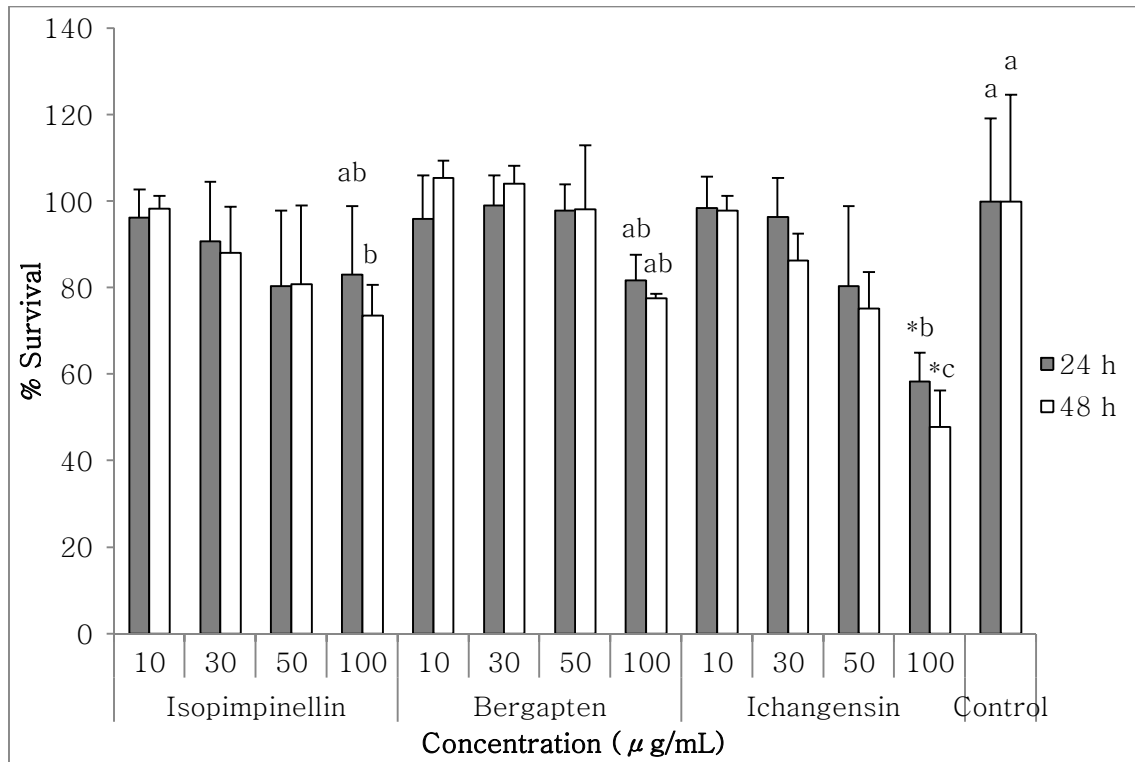


Fig. 7. Viability of HT-29 cells treated with isopimpinellin, bergapten, and ichangensin
 Values represent mean \pm standard deviation (n=3).

***, ** Significantly different from the control (* <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 ; t-test).

a,b,c Values with different superscripts in the same concentrations are significantly different ($P<0.05$; one-way repeated of variance and Duncan' s multiple range test).

처리하였을 때는 xanthotoxin, isopimpinellin, bergapten의 순으로 높았으며, 인간 백혈병세포(U937)에 처리하였을 때는 xanthotoxin이 가장 높고 그 다음으로 isopimpinellin과 bergapten이 유사한 활성을 보였다.

본 연구에서는 preparative LC를 이용하여 분리한 ichangensin이 HT-29 세포의 성장을 유의적으로 억제하였고($P<0.05$), isopimpinellin과 bergapten에 비하여 더 강한 억제능을 보였다. Ichangensin은 암세포 성장 억제 효과가 있다고 알려진 limonoid 계통에 속하는 물질이다. 그러나 ichangensin의 암세포 성장 억제 효과에 대한 연구는 거의 없다. Miller 등(2004)은 ichangensin의 항암효과에 대하여 연구하였는데, ichangensin이 oral cancer를 감소시키지 못하였다고 보고하였다. 따라서 앞으로 ichangensin의 항암효과를 확인하기 위한 연구가 진행될 필요가 있다.

IV. 결론

본 연구는 유자씨 유지 추출물과 그 분획물의 일부가 HT-29 세포에 대한 성장 억제 효과를 보임을 확인하였다. 그러나 유자씨 추출물과 limonin, nomilin은 거의 효과가 없었다. 분획물을 이용한 MTT-assay를 이용하여 유자씨 유지 추출물의 암세포 성장 억제 효과에 핵심적인 역할을 하는 성분을 추정하였고, 효과가 있는 분획물 내에 있는 물질의 효과를 MTT-assay로 확인하였다. 따라서 isopimpinellin, bergapten, ichangensin이 유자씨 유지내의 주요 암세포 성장 억제 물질이며, ichangensin이 가장 높은 활성을 보였다. 본 연구 결과는 유자씨 유지의 기능성 소재로서의 새로운 식품 자원으로서의 활용 가능성이 있음을 시사한다. 그리고 앞으로 유자씨 유지의 암세포 성장 억제 효과의 매커니즘이나 *in vivo*

model에서의 실험을 통해 유자씨 유지의 항암효과에 대한 더 많은 연구를 진행할 필요가 있다.

참고 문헌

권오천, 신정혜, 강민정, 이수정, 최선영, 성낙주, 유자(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) 종실 에탄올추출물의 항산화효과, 한국식품영양과학회지, 35, 294-300, 2006.

서우영, 유자씨의 숙성에 따른 성분 변화 및 검물질의 특성에 관한 연구, 서울대학교 석사학위 논문, 2002.

우강용, 김재이, 김민철, 장덕규, HPLC 및 HPLC/MS를 이용한 유자 씨앗 중 플라보노이드 및 리모노이드 화합물의 분석, 한국식품영양과학회지, 35, 353-358, 2006.

이수정, 최선영, 신정혜, 김성현, 임현철, 성낙주, 유자 종실유의 지방산 조성 및 산화안정성, 생명과학회지, 16, 427-432, 2006.

이윤정, 황인국, 정은미, 김현영, 박의석, 우관식, 정현상. 유자씨 추출물의 생리활성과 암세포 성장 억제효과. 한국식품영양과학회지, 38, 1672-1678, 2009.

BRAY, D., WARHURST, D., CONNOLLY, J., O'NEILL, M. and PHILLIPSON, J. 1990. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of Meliaceae plants and their constituent limonoids. *Phytother. Res.* 4, 29-35.

CHIDAMBARA MURTHY, K.N., JAYAPRAKASHA, G., KUMAR, V., RATHORE, K.S. and PATIL, B.S. 2011. Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2314-2323.

DUGRAND, A., OLRÉ, A., DUVAL, T., HEHN, A., FROELICHER, Y. and BOURGAUD, F. 2013. Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *J. Agr. Food Chem.* 61, 10677-10684.

EMERSON, O.H. 1948. The bitter principles of citrus fruit. I. Isolation of nomilin, a new bitter principle from the seeds of oranges and lemons. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 545-549.

FARHOOSH, R., EINAFSHAR, S., and SHARAYEI, P. 2009. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils, *Food Chem.* 115, 933-938.

FRÉROT, E. and DECORZANT, E. 2004. Quantification of total furocoumarins in citrus oils by HPLC coupled with UV, fluorescence, and mass detection. *J. Agr. Food Chem.* 52, 6879-6886.

- GUTHRIE, N., MORLEY, K., HASEGAWA, S., MANNERS, G.D. and VANDENBERG, T. 2000. Inhibition of human breast cancer cells by citrus limonoids. In *ACS Symposium Series* pp. 164-174, ACS Publications.
- GYAWALI, R., JEON, D.H., MOON, J., KIM, H., SONG, Y.W., HYUN, H.B., JEONG, D. and CHO, S.K. 2012. Chemical composition and antiproliferative activity of supercritical extract of *Citrus grandis* (L.) Osbeck fruits from Korea. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 15, 915-925.
- HASEGAWA, S., BENNETT, R.D. and VERDON, C.P. 1980. Limonoids in citrus seeds: origin and relative concentration. *J. Agr. Food Chem.* 28, 922-925.
- HASEGAWA, S., BENNETT, R.D., HERMAN, Z., FONG, C.H. and OU, P. 1989. Limonoid glucosides in citrus. *Phytochemistry* 28, 1717-1720.
- HERMAN, Z., HASEGAWA, S., FONG, C.H. and OU, P. 1989. Limonoids in *Citrus ichangensis*. *J. Agric. Food Chem.* 37, 850-851.
- HERMAN, Z., FONG, C.H., OU, P. and HASEGAWA, S. 1990. Limonoid glucosides in orange juices by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1860-1861.
- HERMAN, Z., FONG, C. and HASEGAWA, S. 1992. Analysis of limonoids in citrus seeds. In *Seed Analysis* pp. 361-375, Springer.
- HU-HUA, C. and FUMIO, H. 1996. The prospect and current studies on the limonoids in citrus. *Acta Bot. Sin.* 38, 328-336.
- JAYAPRAKASHA, G.K., DANDEKAR, D.V., TICHY, S.E. and PATIL, B.S. 2011. Simultaneous separation and identification of limonoids from citrus using liquid chromatography-collision-induced dissociation mass spectra. *J. Sep. Sci.* 34, 2-10.
- JEONG, J.H., JUNG, H., LEE, S.R., LEE, H.J., HWANG, K.T. and KIM, T.Y. 2010. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chem.* 123, 338-344.
- JOHNSON, J.A., WEBSTER, D. and GRAY, C.A. 2013. The Canadian medicinal plant *Heracleum maximum* contains antimycobacterial diynes and furanocoumarins. *J. Ethnopharmacol.* 147, 232-237.
- KONG, C.-S., UM, Y.R., LEE, J.I., KIM, Y.A., YEA, S.S. and SEO, Y. 2010. Constituents isolated from *Glehnia littoralis* suppress proliferations of human cancer cells and MMP expression in HT1080 cells. *Food Chem.* 120, 385-394.
- MANNERS, G.D. and BREKSA, A.P. 2004. Identifying citrus limonoid aglycones by HPLC-EI/MS and HPLC-APCI/MS techniques. *Phytochem. Anal.* 15, 372-381.

MILLER, E.G., FANOUS, R., RIVERA-HIDALGO, F., BINNIE, W.H., HASEGAWA, S. and LAM, L.K. 1989. The effects of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* 10, 1535-1537.

MILLER, E.G., PORTER, J.L., BINNIE, W.H., GUO, I.Y. and HASEGAWA, S. 2004. Further studies on the anticancer activity of citrus limonoids. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4908-4912.

MILLER, E., GIBBINS, R., TAYLOR, S., MCINTOSH, J. and PATIL, B. 2006. Long term screening study on the potential toxicity of limonoids. In *Potential health benefits of citrus* pp. 82-94, ACS Publications.

NAKAGAWA, H., DUAN, H. and TAKAISHI, Y. 2001. Limonoids from *Citrus sudachi*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 49, 649-651.

OZAKI, Y., MIYAKE, M., MAEDA, H., IFUKU, Y., BENNETT, R.D., HERMAN, Z., FONG, C.H. and HASEGAWA, S. 1991. Ichangensin glucoside in *Citrus junos*, *Citrus sudachi* and *Citrus sphaerocarpa*. *Phytochemistry* 30, 2659-2661.

PEROUTKA, R., SCHULZOV, V., BOTEK, P. and HAJŠLOV, J. 2007. Analysis of furanocoumarins in vegetables (Apiaceae) and citrus fruits (Rutaceae). *J. Sci. Food Agr.* 87, 2152-2163.

POULOSE, S.M., HARRIS, E.D. and PATIL, B.S. 2006. Antiproliferative effects of citrus limonoids against human neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells. *Nutr. Cancer* 56, 103-112.

SHALABY, N.M., ABD-ALLA, H.I., AHMED, H.H. and BASOUDAN, N. 2011. Protective effect of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* against osteoporosis and their phytochemical constituents. *J. Med. Plants Res.* 5, 579-588.

TIAN, Q., MILLER, E.G., AHMAD, H., TANG, L. and PATIL, B.S. 2001. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutr. Cancer* 40, 180-184.

TSIMIDOU, M., PAPADOPOULOS, G. and BOSKOU, D. 1992. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil—Part I. *Food Chem.* 45, 141-144.

UM, Y.R., KONG, C.-S., LEE, J.I., KIM, Y.A., NAM, T.J. and SEO, Y. 2010. Evaluation of chemical constituents from *Glehnia littoralis* for antiproliferative activity against HT-29 human colon cancer cells. *Process Biochem.* 45, 114-119.

VIKRAM, A., JESUDHASAN, P.R., JAYAPRAKASHA, G., PILLAI, S.D. and PATIL, B.S. 2011. Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO. *Microbiology* 157, 99-110.

ZHENG, X., ZHANG, X., SHENG, X., YUAN, Z., YANG, W., WANG, Q. and ZHANG, L. 2010. Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in *Radix Angelicae Dahuricae* by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 51, 599-605.

ZHANG, Y., XU, H., CHEN, X., CHEN, C., WANG, H., MENG, F., YANG, H. and HUANG, L. 2011. Simultaneous quantification of 17 constituents from Yuanhu Zhitong tablet using rapid resolution liquid chromatography coupled with a triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 56, 497-504.

Abstract

Components in Methanol Extracts from Yuja Seeds and Yuja Seed Oil and Their Anti-proliferative Effects on HT-29 Human Colon Cancer Cells

Kyungeun Kim

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Yuja(*Citrus junos*) is a citrus fruits widely consumed in Asian countries, including Korea. Most food products of yuja are processed to a form of Yujachong in Korea. Since yuja seeds contain large amounts of lipid, yuja seed oils could be extracted from yuja seeds which are a by-product of the process to make Yujachong. Yuja seed oils are used for cosmetic and food products.

The objective of this study was to investigate the anti-proliferative effects of methanol extracts from yuja seeds and yuja seed oil on HT-29 cells and to identify key compounds responsible for the anti-proliferative effect. Identification of these bioactive compounds in yuja seed oil may provide basic information for further utilization of yuja seeds and yuja seed oil in food and pharmaceutical industry.

After obtaining the extracts from yuja seeds, hexane-extracted yuja seed oil, and cold-pressed yuja seed oil, composition of the extracts was determined using HPLC-MS. Anti-proliferative effect of the extracts on HT-29 cells was determined. The extracts were fractionated using preparative LC followed by determination of anti-proliferative effect of the fractions on HT-29 cells and composition of the fractions. Composition and anti-proliferative effect of main compounds in the fractions on HT-29 cells was determined.

In the extracts from yuja seeds, hexane-extracted yuja seed oil, and cold-pressed yuja seed oil, limonin glucoside, deacetyl nomilinic acid glucoside, isoobacunoic acid glucoside, deoxylimonol, nomilin glucoside, obacunone glucoside, bergapten, isopimpinellin, isoobacunoic acid, byakangelicin limonin, calamin, ichangensin, and nomilin were detected. The contents of limonin and nomilin of the extract from yuja seeds were 111.4 ± 15.2 and 103.4 ± 6.5 mg/100 g dry seed, respectively, and 52.2 ± 3.4 and 93.0 ± 7.3 mg/100 g oil from cold-pressed yuja seed oil, respectively. However, limonin and nomilin were not detected in the extract from hexane-extracted yuja seed oil.

The extracts from hexane-extracted yuja seed oil and cold-pressed yuja seed oil could reduce the growth of HT-29 cells (IC_{50} (24 h): the extract from hexane-extracted yuja seed oil: 0.176 mg/mL; the extract from cold-pressed yuja seed oil: 0.182 mg/mL; IC_{50} (48 h): the extract from hexane-extracted yuja seed oil: 0.116 mg/mL and the extract from cold-pressed yuja seed oil: 0.114 mg/mL). On the other hand, the extract from yuja seeds, limonin, and nomilin did not reduce the growth of HT-29 cells after 48 h and 24 h of the treatment.

Among six fractions (A–F) from the extract from hexane–extracted yuja seed oil and four fractions (I–IV) from the extract from cold–pressed yuja seed oil, five fractions (C, E, F, III, and IV) were found to have inhibitory effect. Fraction C, E, F, and IV significantly reduced the growth of HT–29 cells after 48 h and 24 h of the treatment. Fraction III and IV significantly reduced the growth of HT–29 cells after 24 h of the treatment (IC_{50} (24 h): C: 63.9, E: 57.8, F: 72.5 μ g/mL; IC_{50} (48 h): C: 33.9, E: 48.9, F: 30.6, IV: 61.1 μ g/mL).

The main compounds of fraction C were heptadecyl methoxybenzoate and isoobacunoic acid. The main compounds of fraction E were isopimpinellin, bergapten, and ichangensin. The main compound of fraction F was ichangensin. The main compound of fraction III was deoxylimonol. The main compound of fraction IV was heptadecyl methoxybenzoate. Among the compounds of these fractions with anti–proliferative effect on HT–29 cells, ichangensin isolated by preparative LC significantly inhibited proliferation of HT–29 cells and had stronger anti–proliferative effect on HT–29 cells than isopimpinellin, bergapten, limonin, and nomilin. Isopimpinellin and bergapten dose–dependently inhibited proliferation of HT–29 cells, but with no significance.

In conclusion, the extracts from hexane–extracted yuja seed oil and cold–pressed yuja seed oil, and some of the fractions had anti–proliferative effect on HT–29 cells. Isopimpinellin, bergapten, and ichangensin were the main compounds with anti–proliferative effect on HT–29 cells. Thus, identification of these bioactive compounds in yuja seed oil may provide basic information

for further utilization of yuja seeds and yuja seed oil in food and pharmaceutical industry.